

STEROIDCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN
IM URIN DER HETEROZYGOTEN DES
ADRENOGENITALEN SYNDROMS

KLAUS VIKTOR TOYKA

1970



Kurfürstendruck
Dipl.-Kfm. A. Koch
8 München 13 · Kurfürstenplatz 6
Fernsprecher 3421 49/399938



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548328_0033

Aus der Kinderklinik der Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. K. Betke

S t e r o i d c h e m i s c h e U n t e r s u c h u n g e n
i m U r i n d e r H e t e r o z y g o t e n d e s
A d r e n o g e n i t a l e n S y n d r o m s

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin

verfaßt und

einer Hohen Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-

Universität zu München

vorgelegt von

Klaus Viktor Toyka

München

München 1970

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Referent: Prof. Dr. med. D. Knorr

Korreferent: Prof. Dr. med. K. Betke

Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 1. Dez. 1970



Inhaltsverzeichnis

- A. Einleitung
- B. Bestimmungs - Methoden
- C. Ergebnisse, Statistik
- D. Diskussion
- E. Zusammenfassung
- F. Literaturnachweis

A. Einleitung

Das kongenitale adrenogenitale Syndrom ist eine bei beiden Geschlechtern vorkommende, hereditäre Nebennierenrindenstörung. Ursache ist ein genetisch bedingter Enzymmangel in der Biosynthese der Steroidhormone. Bei den beiden häufigsten Formen des AGS liegt ein mehr oder weniger stark ausgeprägter 21-Hydroxylase-Mangel vor (BONGIOVANNI,5,6; EBERLEIN,14; KELLEY,23; KNUDSON,28). Die sehr seltene Form des 11-Hydroxylase-Mangels und die des 3β -ol-Dehydrogenase-Mangels (BONGIOVANNI,7) bleiben im folgenden unberücksichtigt.

Beim unkomplizierten AGS kommt es infolge eines partiellen 21-Hydroxylase-Defektes primär zu einer Verminderung der Cortisol-Synthese. Da nur dieses Steroidhormon ACTH-Sekretionshemmende Funktion besitzt, schüttet die Adenohypophyse vermehrt ACTH aus. Die Nebennierenrinde produziert sekundär vermehrt Androgene und im Rahmen der verbliebenen Synthesemöglichkeit auch Cortisol. In allen Fällen gelingt es der bis zur Hypertrophie stimulierten NNR, einen ausreichenden Glucocorticoidspiegel bei stark erhöhter Androgensekretion zu erreichen. Die Mineralocorticoid-Synthese ist beim unkomplizierten AGS durch den Enzymmangel zwar mitbetroffen, die Aldosteron-Produktion ist jedoch ausreichend (DEGENHART,12). KOWARSKI (29) und BARTTER (2) fanden bei ihren Patienten hingegen erhöhte Aldosteron-Werte. BARTTER stellt die Hypothese auf, daß zwei Isoenzyme der 21-Hydroxylase existieren: das eine nur für die 21-Hydroxylierung von 17α -Hydroxyprogesteron (im Falle des unkomplizierten AGS), das andere für die 21-Hydroxylierung von 17α -Hydroxyprogesteron und Progesteron.

Klinisch bewirken die vermehrten Androgene Testosteron, Androstendion und 11-Hydroxyandrostendion (DORFMAN,41; CAMACHO,9) eine Virilisierung bei den Mädchen (Pseudohermaphroditismus femininus (PRADER,35)), bei den Jungen eine Pseudopubertas praecox. Bei beiden Geschlechtern liegt außerdem eine allgemeine Wachstumsbeschleunigung vor.

Das AGS mit Salzverlust wird durch völliges Fehlen der 21-Hydroxylase hervorgerufen. Hierbei sind zusätzlich die Mineralocorticoide vermindert. Aldosteron ist als wesentliches Hormon dieser Gruppe meist erniedrigt. Vor allem bewirkt diagnostischer Salzentzug in der Diät keine reaktive Sekretionszunahme wie beim unkomplizierten AGS (DEGENHART,12; KOWARSKI,29). Andere Autoren haben jedoch normale bzw. erhöhte Aldosteronwerte gefunden und führen das Symptom des Salzverlusts auf die Wirkung von Aldosteron-Antagonisten zurück (salt-excreting-factor (PRADER,38; KLEIN,24)).

Klinisch treten die Folgen des Mineralocorticoid-Mangels gegenüber den androgenen Wirkungen in den Vordergrund. Der insuffiziente Natrium-Reabsorptions-Mechanismus im Nierentubulus bewirkt Natrium- und Wasser-Diurese mit lebensbedrohlichen Krisen.

Der Nachweis des AGS gelingt durch Untersuchung der Steroidausscheidung im 24h-Urin. Die 17-Ketosteroide (entsprechend einigen Androgenmetaboliten), die totalen 17-Hydroxycorticoide (Metabolite der Glucocorticoid-Synthese einschließlich Cortisol), Testosteron und spezifisch das Pregnanetriol (BONGIOVANNI,4) sind unterschiedlich stark erhöht.

Die Therapie des unkomplizierten AGS mit Cortison entdeckten WILKINS (47,48) und GRUMBACH (18). Bei lebenslanger Substitution werden Steroidbefunde und Wachstumsverlauf normalisiert. Bereits erfolgte Virilisierungserscheinungen bei den Mädchen bilden sich jedoch nicht zurück.

Beim Salzverlustsyndrom sind außerdem Mineralocorticoid-Gaben und erhöhte Salzzufuhr notwendig.

Die Häufigkeit des AGS wird von CHILDS (10) noch mit 1 : 6 700 angegeben. PRADER (36) ermittelt im Kanton Zürich etwas später eine Frequenz von ca. 1 : 5 000. Er errechnet daraus eine Heterozygoten-Häufigkeit von 1 : 35. Allerdings vermutet er, daß allen von ihm beobachteten Fällen (mit Ausnahme des AGS mit Hypertension) ein einheitlicher Gendefekt zugrunde liegt.

Angesichts dieser Genhäufigkeit ist es sinnvoll, nach einem Heterozygotentest zu suchen. LINNEWEH (30) hat für drei andere hereditäre Erkrankungen solche Untersuchungen angestellt: Ahornsirup-Krankheit, Phenylketonurie und Galaktosämie. Er weist darauf hin, daß Heterozygotentests nur dort einen Sinn haben, wo jeder Heterozygote irgendein nachweisbares Merkmal trägt.

Wir haben die Urine der Eltern unserer AGS-Patienten daraufhin untersucht, ob Abweichungen ihrer Steroidausscheidung gegenüber Normalpersonen bestehen. Dazu haben wir die Heterozygoten in zwei Gruppen eingeteilt:

Gruppe U umfaßt 13 Väter und 14 Mütter, deren Kinder am unkomplizierten AGS leiden;

Gruppe SV umfaßt 10 Elternpaare von Kindern mit adrenogenitalem Salzverlustsyndrom.

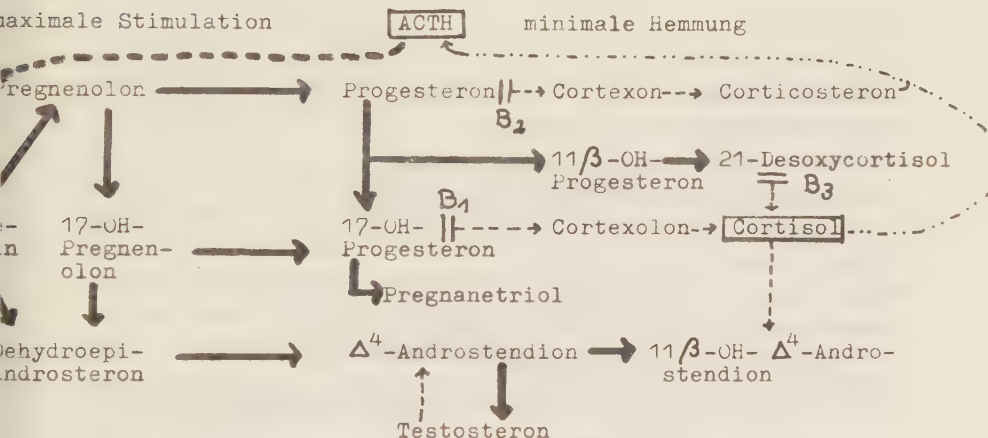
Bestimmt wurden im 24h-Urin:

die neutralen 17-Ketosteroide (17-KS),
die totalen 17-Hydroxycorticoide (17-OHCS),
Pregnanetriol (β -Pregnane-3 α ,17 α ,20 α -triol) und
Testosteron.

Die Werte für Pregnanetriol und Testosteron wurden von der Endokrinologischen Abteilung übernommen.

Schema der Steroidhormon-Synthese beim AGS (in Anlehnung an

SOFFER, LORFMAN, GABRILOVE: The human adrenal gland (41))



Block₁ (+ Block₃) = unkompliziertes AGS

Block₁ + Block₂ (+ Block₃) = AGS mit Salzverlust

$\longrightarrow$ verstärkte Synthese
 $\longrightarrow$ verminderte Synthese
 $\longrightarrow$ maximale Stimulation
 $\longrightarrow$ minimale Hemmung
 B = Block

B. Bestimmungsmethoden

(Vgl. allg. HÜBNER und STAIB, 20)

I. Neutrale 17-Ketosteroide nach ZIMMERMANN und PONTIUS (49,50)
(modifiz. nach KNORR)

Reagenzien:

Salzsäure, konz.

Natriumhydroxyd in 10% Lösung

Natriumcarbonat in gesättigter Lösung

Kaliumhydroxyd in 3n Lösung

Diäthyläther

Äthanol absol.

Dinitrobenzol in 2% Lösung

Dehydroepiandrosteron (DHA), 20 mg in 100 ml

Äthanol absol. (Schering)

Alle Reagenzien p.a. (soweit nicht anders angegeben: Merck)

a) Säurehydrolyse:

50 ml Urin + 5 ml konz. HCl

20 Minuten im siedenden Wasserbad kochen.

b) Extraktion:

1. Extraktion mit 50 ml Äther,

2. Extraktion mit 30 ml Äther, je 2 Min.

c) Waschen des Extraktes:

1. mit 25 ml 10% NaOH - Lös.,

2. mit 25 ml gesättigter Na_2CO_3 - Lös.,

3. mit 25 ml 10% NaOH - Lös.,

4. mit 3 mal je 30 ml Aqua dest. und
zur Trockne einengen.

d) Colorimetrie:

Trockenextrakt in 5 ml Äthanol absol. aufnehmen.

Reagenzienreihe nach folgender Tabelle:

RL = Reagenzien-Leerwert

StL/StH = Standard-Leer-/Standard-Hauptwert

PrL/PrH = Proben-Leer-/Proben-Hauptwert

Reagenz	RL	StL	StH	PrL	PrH
2 ml 3n KOH	+	+	+	+	+
2 ml Äthanol absol.	+	+	-	+	-
0,5 ml 20 mg% DHA	-	+	+	-	-
2 ml Extrakt in Äthanol	-	-	-	+	+
1,5 ml Äthanol absol.	-	+	+	-	-
2 ml 2% Dinitrobenzol	+	-	+	-	+

Die hergestellten Lösungen werden geschüttelt und

1 Std. bei 25°C im Wasserbad gehalten.

Zusätzlich in jedes Reagenzglas 3 ml Aqua dest. + 7 ml Äther zur Extraktion geben und intensiv schütteln.

Die Messung muß innerhalb von 30 min erfolgen:

Zeiss - Spektralphotometer PMQ II; $\lambda = 515 \text{ nm}$; Filter O

(Die neutralen 17-Ketosteroiden werden als Dehydroepiandrosteron-Äquivalente angegeben. Diese Vereinfachung ist nötig, weil das Farbäquivalent der einzelnen Ketosteroiden nicht ganz einheitlich ist (FREISLEDERER, 16).)

Abgelesen werden

1. die Extinktion des RL gegen Äther = E_{RL} ,

2. die Extinktion des StH gegen StL = E_{St} ,

3. die Extinktion der PrH gegen die PrL = E_{Pr} .

In StL und StH sind je 0,1 mg DHA enthalten (entsprechend 0,5 ml einer 20 mg% Lösung).

Die vollständigen Gleichungen zur Berechnung der 17-KS lauten:

$$a) E_{\text{Eichwert}} = E_{St} - E_{RL} \quad ; \quad E = \text{Extinktion}$$

$$b) \frac{(E_{Pr} - E_{RL}) \cdot 5(\text{ml}) \cdot 0,1(\text{mg}) \cdot \text{Urntagesmenge}(\text{ml/d})}{E_{\text{Eichwert}} \cdot 50(\text{ml}) \cdot 2(\text{ml})} = 17\text{-KS (mg/d)}$$

vereinfacht:

$$17\text{-KS (mg/d)} = \frac{(E_{Pr} - E_{RL}) \cdot 0,005 \cdot \text{Urntagesmenge}(\text{ml/d})}{E_{\text{Eichwert}}}$$

- II. Totale 17-Hydroxycorticoide nach APPLEBY und GIBSON (1)
Diese Methode erfaßt alle 17-OHCS, d.h. nicht nur die mit einer Dioxyaceton-Seitenkette wie die Methode nach PORTER und SILBER (40).

Reagenzien:

vgl. 17-KS; zusätzlich:

Natriumborhydrid

Natriumbismutat

Natriumthiosulfat in 30% Lösung

Essigsäure, konz.

Tetraammoniumhydroxyd (TMAH) in 2,5% Lösung

Alle Reagenzien p.a. (soweit nicht anders angegeben: Merck)

- a) Reduktion der Seitenkette mit Na-Borhydrid:
20 ml Urin mit 100 mg Na-Borhydrid versetzen und
1 Tag im Dunkeln stehen lassen.
- b) Oxydative Abspaltung der Seitenkette:
Zur obigen Lösung
20 ml Eisessig und 5 g Na-Bismutat geben;
1 Std. im Dunkeln schütteln, dann etwa
12 Std. im Dunkeln stehen lassen. Anschließend bei
2 500 U/min zentrifugieren und vom Überstand
25 ml abnehmen.
- c) Säurehydrolyse:
Zum abpipettierten Überstand
21,5 ml Aqua dest.,
3,5 ml 30% Na-Thiosulfat-Lösung,
5 ml konz. HCl geben und 15 min im siedenden Wasserbad
kochen. Abkühlen.
- d) Extraktion:
2 mal Extraktion mit je 30 ml Äther, je 2 min .
- e) Waschen des Extraktes:
2 mal mit je 25 ml 10% NaOH-Lösung,
3 mal mit je 30 ml Aqua dest. und
zur Trockne einengen.
- f) Colorimetrie:
Trockenextrakt in 1 ml Äthanol absol. aufnehmen.

Reagenzienreihe nach folgender Tabelle:

RL = Reagenzien-Leerwert

StW = Standardwert

PrW = Probenwert

Reagenz	RL	StW	PrW
0,2 ml TMAH	+	+	+
0,2 ml 2% Dinitrobenzol	+	+	+
0,2 ml Äthanol absol.	+	-	-
0,2 ml 20 mg% DHA	-	+	-
0,2 ml Extrakt in Äthanol	-	-	+

Die hergestellten Lösungen werden geschüttelt und

1 Std. bei 25°C im Wasserbad gehalten.

Zusätzlich in jedes Reagenzglas

2 ml 30% Äthanol + 7 ml Äther zur Extraktion geben und intensiv schütteln.

Die Messung muß innerhalb von 30 min erfolgen:

Zeiss - Spektralphotometer PMQ II; $\lambda = 515 \text{ nm}$; Filter O

Abgelesen werden die Extinktionen des StW und der PrW gegen den RL.

Im StW sind 0,04 mg DHA enthalten (entsprechend

0,2 ml einer 20 mg% Lösung).

Die vollständige Gleichung zur Berechnung der 17-OHCS lautet:

$$E_{PrW} \cdot 0,04(\text{mg}) \cdot 1(\text{ml}) \cdot \frac{40(\text{ml})}{25(\text{ml})} \cdot \text{Urintagesmenge}(\text{ml/d})$$

$$E_{StW} \cdot 20(\text{ml}) \cdot 0,2(\text{ml})$$

= 17-OHCS (mg/d)

vereinfacht:

$$17\text{-OHCS (mg/d)} = \frac{E_{Pr} \cdot 0,016 \cdot \text{Urintagesmenge}(\text{ml/d})}{E_{StW}}$$

III. Progesteron (gaschromatographisch) in Ablehnung von
LUKKAINEN et al.(30), V.D.HEUVEL et al.(44) und
LEHNERT et al.(29)

Reagenzien:

Salzsäure in 2n Lösung

Natriumhydroxyd in 10% Lösung

Acetat - Puffer p_H 6,15

Natriumazid in 400 mg% Lösung

β - Glucuronidase/Aryl-Sulfatase (Boehringer Mannheim)

Diäthyläther

Natriumcarbonat in gesättigter Lösung

Aluminiumoxyd standard. nach Brockmann mit 3,5% H_2O

Benzol

Benzol, wassergesättigt

Benzol mit 0,25%, 0,5%, 0,75%, 1,1%, 10% Äthanol

Aceton

Tetrahydrofuran (peroxydfrei)

Hexamethyldisilazan (Fluka, Buchs, Schweiz)

Trimethylchlorsilan (" " ")

Isooctan zur UV - Spektralanalyse

Östron (Schering)

Pregnanetriol (Schering)

Alle Reagenzien p.a. (soweit nicht anders angegeben: Merck)

a) Hydrolyse:

50 ml Urin mit 2n HCl bzw. 10% NaOH auf p_H 6,1 einstellen,

10 ml Acetat - Puffer p_H 6,15,

1 ml 400 mg% NaN_3 - Lösung und

0,5 ml β - Glucuronidase/Aryl-Sulfatase zugeben. Bei $37^\circ C$ 24 Std. inkubieren. Danach Probe auf p_H 4,5 mit 2n HCl einstellen und bei $37^\circ C$ 24 Std. inkubieren.

b) Extraktion:

2 mal Extraktion mit je 70 ml Äther, je 2 min.

c) Waschen des Extraktes:

1. mit 25 ml 10% NaOH-Lösung,

2. mit 25 ml gesättigter Na_2CO_3 -Lösung,

3. mit 25 ml 10% NaOH-Lösung,

4. mit 3 mal je 30 ml Aqua dest. und zur Trockne einengen.

d) Säulenchromatographie:

5 ml wassergesättigtes Benzol und

3 g Aluminiumoxyd mit 3,5% H₂O in die Säule geben und mit Seesand abdecken.

Trockenextrakt in 2 mal 5 ml Benzol aufnehmen und auf die Säule geben.

1) Zur Reinigung und Elution der 17-KS jeweils

5 ml Benzol mit 0,25% Äthanol,

5 ml " mit 0,5% " ,

5 ml " mit 0,75% " ,

15 ml " mit 1,1% " nacheinander durch die Säule laufen lassen.

2) Elution des Pregnanediols und Pregnanetriols:

10 ml Benzol mit 10% Äthanol auf die Säule geben und auffangen.

50 µg Östron als internen Standard zusetzen und zur Trockne einengen.

3) Trockenextrakt mit 1 ml Aceton herunterspülen und erneut abdampfen.

e) Herstellung der Standards:

50 µg Östron und

50 µg Pregnanetriol getrennt abfüllen und Lösungsmittel abdampfen.

Zu beiden Substanzen jeweils

0,2 ml Tetrahydrofuran,

0,1 ml Hexamethyldisilazan und

0,02 ml Trimethylchlorsilan zusetzen. 12 Std. im Dunkeln stehen lassen. Danach im Stickstoffstrom abdampfen.

Trockenextrakt in 0,1 ml Isooctan lösen: $5 \mu\text{l} \hat{=} 2,5 \mu\text{g}$

f) Silanisieren der Probe:

Zum Trockenextrakt

0,2 ml Tetrahydrofuran,

0,1 ml Hexamethyldisilazan und

0,02 ml Trimethylchlorsilan zusetzen. 12 Std. im Dunkeln stehen lassen. Danach im Stickstoffstrom abdampfen und

30 min in der Ölvakuumpumpe nachtrocknen.

g) Gaschromatographie:

Trockenextrakt in 0,05 ml Isooctan lösen. Nach 30 min

5 oder 10 μ l auf den Gaschromatographen (Packard - System Nr. 7820) aufspritzen.

Detektor: Argon Ionisations-Detektor

Detektortemperatur: 215 $^{\circ}$ C

Säulenmaterial: 3% XE 60 auf Gaschrom Q

Ganzglassäule: Länge 180 cm, Durchmesser 3 mm

Säulentemperatur: 215 $^{\circ}$ C

Spannung: + 500 V

Empfindlichkeit: 1 $\cdot$ 10 $^{-8}$ A

h) Berechnung:

Die Flächen unter den einzelnen Peaks werden berechnet; dann wird der Mittelwert der Flächen unter den Standard-Peaks ermittelt. Schließlich werden die Flächen unter den Östron-Peaks der Standards zu denen der Proben in Relation gesetzt:

$$\frac{\text{Östron}_{\text{Standard}}\text{-Fläche}}{\text{Östron}_{\text{Probe}}\text{-Fläche}} = \text{Faktor}_{\text{Östron}}$$

$$\text{Pregnanetriol } (\mu\text{g/d}) = \frac{\text{PrFl} \cdot \text{StM} \cdot \text{Lm} \cdot \text{Utm} \cdot \text{Faktor}_{\text{Östron}}}{\text{StFl} \cdot \text{iM} \cdot \text{Ua}}$$

PrFl/StFl = Proben/Standard-Fläche (mm 2)

StM = Standardmenge (μ g)

Lm = Lösungsmittelmenge (μ l)

iM = von der Probe injizierte Menge (μ l)

Utm = Urintagesmenge (ml/d)

Ua = Menge des Urinansatzes (ml)

=====

IV. Testosteron (gaschromatographisch) in Anlehnung an BROWNIE et al.(8). Zur Dünnschichtchromatographie vgl. STAHL (42)

Reagenzien:

Salzsäure in 6n Lösung

Essigsäure, konz.

Chloroform

Acetat - Puffer 0,1 m; p_H 5,4

Ketodase (General Diagnostics Division, Warner Chilcott Lab.)

Diäthyläther

Natriumhydroxyd in 10% Lösung

Natriumsulfat (wasserfrei)

Benzol

Benzol mit 0,25% Äthanol und mit 1,1% Äthanol

Aluminiumoxyd standard. nach Brockmann mit 5% H_2O

Methanol

Äthylacetat

Benzol mit Äthylacetat im Verhältnis 1 : 1 und 6 : 1

Hexan mit Hexanol im Verhältnis 45 : 55

Monochloressigsäureanhydrid

500 mg in 10 ml Tetrahydrofuran

Pyridin (wasserfrei)

Isooctan zur UV - Spektralanalyse

Testosteron (Schering)

4- C^{14} - Testosteron, spezif. Aktivität: 45,2 mCi/mMol

(New England Nuclear Corp.)

Zur Szintillationslösung:

POPOP (Packard) 1,4-bis-2(4-Methyl-5-Phenyloxazolyl-)benzene

PPO (Packard) 2,5-Diphenyloxazol

Toluol

Alle Reagenzien p.a. (soweit nicht anders angegeben: Merck)

a) Hydrolyse:

100 ml Urin mit ca.

30 000 counts/min 4- C^{14} - Testosteron versetzen, mit

Eisessig auf p_H 5 einstellen und 1/10 Vol. Acetat -

Puffer p_H 5 zur Stabilisierung zufügen. Zusätzlich

20 ml Ketodase (ca. 1000 I.E./ml Urin) und

0,5 ml Chloroform zugeben. Bei 37°C 48 Std. inkubieren.

Abkühlen.

b) Extraktion:

2 mal Extraktion mit je 50 ml Äther, je 2 min.

c) Waschen des Extraktes:

2 mal mit je 20 ml 10% NaOH - Lösung,

2 mal mit je 50 ml Aqua dest.. Über Natriumsulfat

(wasserfrei) filtrieren und zur Trockne einengen.

d) Säulenchromatographie:

5 ml Benzol und

3 g Aluminiumoxyd mit 5% H₂O in die Säule geben und mit Seesand abdecken.

Trockenextrakt in 2 mal 5 ml Benzol aufnehmen und auf die Säule geben.

1) Zur Reinigung 30 ml Benzol mit 0,25% Äthanol durch die Säule laufen lassen.

2) Die das Testosteron enthaltende Fraktion mit 40 ml Benzol mit 1,1% Äthanol eluieren und zur Trockne einengen.

3) Trockenextrakt mit 3 mal 2 ml Methanol überspülen und im Stickstoffstrom abdampfen.

e) Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie:

Trockenextrakt in 2 mal 50 µl Methanol aufnehmen und punktförmig auf die Platte auftragen.

1. Laufmittel: Benzol mit Äthylacetat 1 : 1, bis zur Front in der BN - Kammer (DESAGA) laufen lassen;

2. Laufmittel: Hexan mit Hexanol 45 : 55, senkrecht stehend ca. 2 Std. laufen lassen. Im Vacuum trocknen.

Der Testosteron - spot wird am Scanner (BERTHOLD) lokalisiert und unter UV-Licht eingezeichnet.

Elution des spot:

Deaktivierung des Silikagels mit 0,05 ml Aqua dest. und Elution mit 2 mal 0,5 ml Methanol. Abdampfen.

f) Monochloracetylierung:

Zum Trockenextrakt

0,1 ml Monochloressigsäureanhydrid Lösung,

0,01 ml Pyridin (wasserfrei) geben und 10 min bei 60°C inkubieren.

0,5 ml Aqua dest. und 1 ml Äthylacetat zusetzen.

2 min extrahieren und die wäßrige Phase absaugen.

Reinigen mit 0,5 ml 6n HCl und absaugen; dann

2 mal mit 0,5 ml Aqua dest. reinigen, absaugen und im Stickstoffstrom abdampfen.

g) Dünnschichtchromatographie:

Trockenextrakt in 2 mal 50 µl Äthylacetat aufnehmen und

bandförmig auftragen. Laufmittel: Benzol mit Äthylacetat 6 : 1; bis zur Front in der BN - Kammer laufen lassen. Testosteron - spot am Scanner ermitteln und unter UV-Licht einzeichnen. Elution mit

1. 0,5 ml Äthylacetat und 0,05 ml Aqua dest.,
2. 0,5 ml Äthylacetat. Abdampfen.

h) Herstellung des Standards:

20 mg Testosteron werden in entsprechender Weise monochloracetyliert und extrahiert. Das erhaltene Produkt wurde zweimal aus wäßrigem Aceton umkristallisiert.

i) Gaschromatographie:

Trockenextrakt in 50 oder 100 μ l Isooctan lösen und

1. 1/10 dieser Lösung zur Wiederfindung mit 10 ml Szintillationslösung (0,1 mg POPOP und 4 mg PPO und Toluol ad 1000 ml) versetzen;
2. je nach der erwarteten Substanzmenge 2,5 oder 5 μ l auf den Gaschromatographen (Packard-System Nr. 7631) aufspritzen;
3. zur Standardisierung am Anfang des Chromatogramms 5, 30 oder 40 μ g Testosteronmonochloracetat aufspritzen.
Detektor: Elektron Capture Detektor; H^3 - Folien
Detektortemperatur: 215°C
Säulen: 3% SE 30 auf Gaschrom Q, 180 cm, Durchmesser 3 mm
1% XE 60 auf Gaschrom Q, 30 cm
Säulentemperatur: 220°C
Spannung: + 20 V
Trägergas: N_2 40 ml/min
Empfindlichkeit: $3 \cdot 10^{-9}$ A

k) Berechnung:

Die Flächen unter den einzelnen Peaks werden berechnet.

Testosteronmonochloracetat (μ g/d) (TMCA)

$$= \frac{\text{PrFl} \cdot \text{StM} \cdot \text{Lm} \cdot 100}{\text{StFl} \cdot \text{Wf} \cdot \text{iM} \cdot \text{Ua}}$$

PrFl/StFl = Proben-/Standard-Fläche (mm^2)

StM = Standardmenge (μ g)

Lm = Lösungsmittelmenge (μ l)

iM = von der Probe injizierte Menge (μ l)

U_{tm} = Urintagesmenge (ml/d)

U_a = Menge des Urinansatzes (ml)

W_f = Wiederfindung des internen 4-C¹⁴- Testosteron-Standards

Das Testosteron wurde oben monochloracetyliert. Um die gesuchte Menge Testosteron zu erhalten, müssen die Molekulargewichte der beiden Substanzen durcheinander dividiert werden:

$$\frac{MG_{\text{Testosteron}}}{MG_{\text{TMCA}}} = \frac{288,43}{364,47} \approx 0,8$$

$$\text{Testosteron } (\mu\text{g/d}) = \text{TMCA} \cdot 0,8$$

=====

Genauigkeit der Methoden:

I. und II.: Zur Präzision der Bestimmungsmethoden für die 17-KS und die 17-OHCS sei auf KNORR (25) verwiesen.

III.: Zur Überprüfung der Genauigkeit unserer gaschromatographischen Methode wurden die Urine von 2 AGS-Patienten und 3 Normalpersonen je zweimal untersucht. (Pregnanetriol)

Werte (μg/d):	x ₁	x ₂	$\bar{x}$
1.	179 839	140 955	160 397
2.	16 551	11 241	13 896
3.	2 992	2 434	2 713
4.	25	22	23,5
5.	147	133	140

Berechnung des Variationskoeffizienten aus der Differenz der Wertpaare (Δx) in Prozent des Mittelwertes nach folgender Gleichung:

$$v (\%) = \sqrt{\frac{\sum (\Delta x \cdot \frac{100}{\bar{x}})^2}{2 n}}$$

$$v (\%) = 11,9$$

IV.: Zur Überprüfung der Genauigkeit unserer gaschromatographischen Methode wurden die Urine von 6 erwachsenen Normalpersonen und 3 gesunden Kindern je 2 x untersucht. (Testosteron)

Werte ($\mu\text{g/d}$):	x_1	x_2	$\bar{x}$
a) Erwachsene:			
1.	78,5	59,9	69,2
2.	20,5	16,7	18,6
3.	26,9	23,8	25,35
4.	13,8	12,6	13,2
5.	21	20,9	20,95
6.	20	18,5	19,25
b) Kinder:			
7.	2	3,1	2,55
8.	2,8	3,7	3,25
9.	3,3	1,7	2,5

Berechnung des Variationskoeffizienten der Wertpaare 1 - 6 nach der unter III. angegebenen Gleichung:

$$v (\%) = 11 \%$$

Bei den kindlichen Werten ist der relative Fehler wegen der absolut kleinen Werte natürlich sehr hoch; bei einer absoluten Streubreite von 0,55 - 0,8 μg in unseren Beispielen kann die Methode jedoch als gute bezeichnet werden.

C. Ergebnisse, Statistik

Gruppe U = unkompliziertes AGS

Gruppe SV = AGS mit Salzverlust

Gruppe N = Normalpersonen

Väter/Männer = ♂

Mütter/Frauen = ♀

Triol = Pregnanetriol

Utm = Urintagesmenge

Testosteronwerte in Klammern: Methode nach VERMEULEN und
VERFLANCKE (46,26)

U♂

Nr.	17-KS (mg/d)	17-OHCS (mg/d)	Triol (µg/d)	Testosteron (µg/d)	Utm (ml/d)
1	12,2	14,0	1430	(59,5)	1010
3	14,6	6,55	1550	(129,0)	2265
6	15,4	10,9	2960	(110,0)	1310
8	17,0	17,8	3750	74,5	1195
9	7,7	9,3	1350	55,1	800
13	9,2	9,5	77	73,0	810
14	16,0	11,15	1970	31,8	1475
15	12,6	5,65	2180	21,0	1480
17	6,1	3,8	960	63,8	1370
18	17,4	10,1	56	56,9	885
19	15,1	10,3	1300	30,8	1155
20	8,7	6,9	7240	45,2	1330
22	22,7	22,2	24200	152,0	1475

SV♂

Nr.	17-KS (mg/d)	17-OHCS (mg/d)	Triol (μg/d)	Testosteron (μg/d)	Utm (ml/d)
2	15,8	13,8	2810	(156,0)	1090
4	10,8	14,9	1670	(128,5)	1225
5	18,7	16,15	2330	(145,5)	1585
7	14,1	16,3	2960	(94,0)	1550
10	13,6	13,6	2190	79,7	1155
12	15,4	14,3	-	67,0	1270
16	11,1	13,7	1590	22,7	800
21	21,5	12,3	3260	106,0	1535
23	13,4	13,1	3050	19,2	1095
24	10,3	8,8	3890	57,6	1155

N♂

Nr.	17-KS (mg/d)	17-OHCS (mg/d)	Triol (μg/d)	Testosteron (μg/d)	Utm (ml/d)
1	10,4	10,4	2120	73,5	1210
2	13,0	12,3	5990	68,0	1425
3	25,3	19,4	3875	216,0	1390
4	5,6	8,7	4450	55,0	1170
5	10,5	6,4	1720	55,0	1030
6	-	-	2000	60,0	985
7	-	-	1690	-	1320

Vergleichswerte anderer Autoren für N♂ :

17-KS: 8 - 27 mg/d (CERTEL, 33)

17-OHCS: 5,9 - 19,8 mg/d (GREEN, 17)

Testosteron: 36,8 - 133,2 μg/d (FRANCE u. KNOX, 15)

U♀

Nr.	17-KS (mg/d)	17-OHCS (mg/d)	Triol (μg/d)	Testosteron (μg/d)	Utm (ml/d)
1	12,5	18,7	1420	(52,5)	1135
3	9,1	7,75	1170	(25,5)	800
6	11,1	9,8	240	(95,5)	1045
8	4,9	5,8	410	12,3	800
9	9,2	8,0	1820	6,4	800
11	8,9	6,5	1560	11,0	800
13	5,6	6,0	965	12,2	1225
14	13,9	10,9	145	15,4	1280
15	6,5	5,0	555	9,9	1400
17	4,3	2,25	990	8,9	1040
18	17,0	12,6	1710	11,2	1185
19	11,4	14,8	1330	20,9	820
20	6,3	9,5	2530	7,7	800
22	16,2	8,3	6960	25,0	1390

SV♀

Nr.	17-KS (mg/d)	17-OHCS (mg/d)	Triol (μg/d)	Testosteron (μg/d)	Utm (ml/d)
2	10,4	9,8	935	(24,1)	1170
4	11,2	7,6	910	(56,5)	980
5	6,7	11,0	480	10,4	810
7	7,1	12,9	1190	5,1	970
10	8,6	8,45	1110	(44,2)	1000
12	13,8	9,0	3000	22,7	1285
16	12,6	13,45	3280	13,7	1275
21	19,4	11,4	500	27,9	1650
23	6,1	9,85	3410	14,5	910
24	11,4	8,3	7160	14,9	800

N♀

Nr.	17-KS (mg/d)	17-OHCS (mg/d)	Triol (μ g/d)	Testosteron (μ g/d)	Utm (ml/d)
1	6,8	5,9	900	3,75	800
2	13,8	12,4	2700	4,2	1160
3	6,6	8,8	3040	6,95	970
4	7,4	9,4	2100	19,2	1310
5	4,0	5,8	555	5,0	800
6	-	-	965	25,3	930
7	-	-	850	5,8	1010

Vergleichswerte anderer Autoren für N ♀ :

17-KS: 6 - 18 mg/d (OERTEL,33)

7,0 - 14,5 mg/d (KARL,22)

Testosteron: 4,5 - 16,0 μ g/d (FRANCE u. KNOX,15)

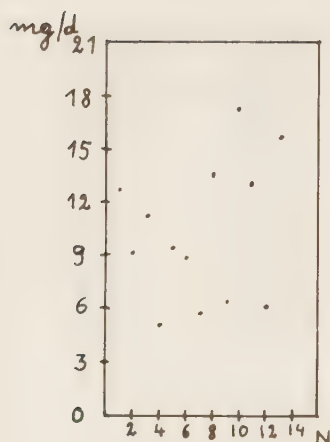
Graphische Darstellung:

KS = 17-Ketosteroide

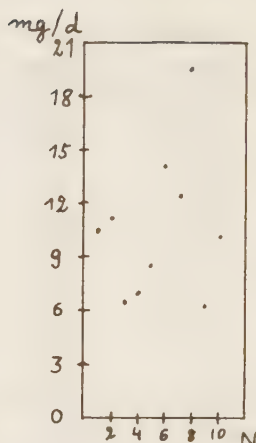
OH = 17-Hydroxycorticoide

Triol = Pregnanetriol

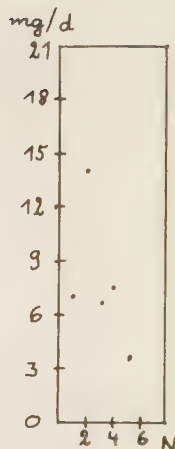
Testo = Testosteron



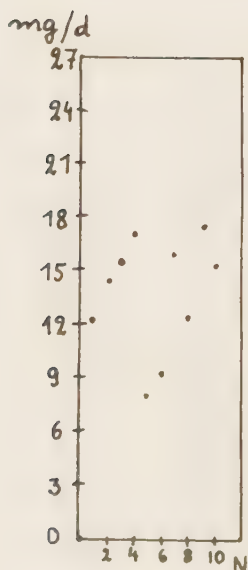
KS:U♀



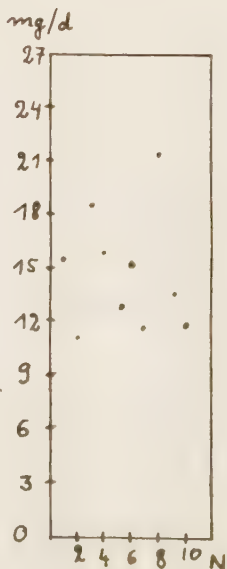
KS:SV♀



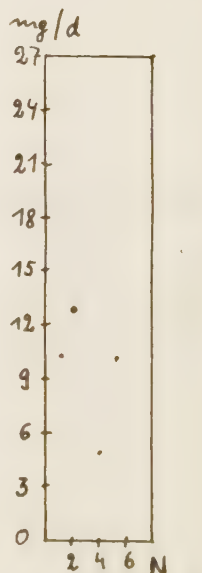
KS:N♀



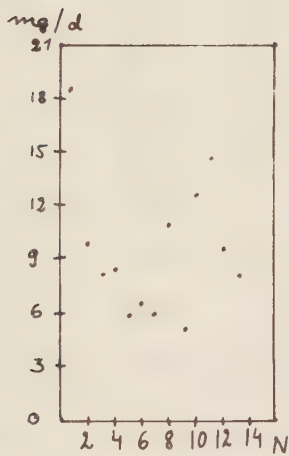
KS:U♂



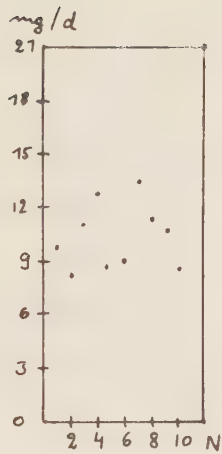
KS:SV♂



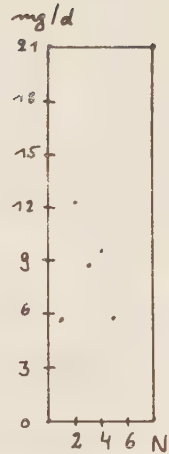
KS:N♂



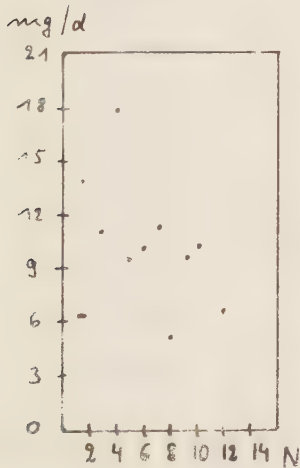
OH:U♀



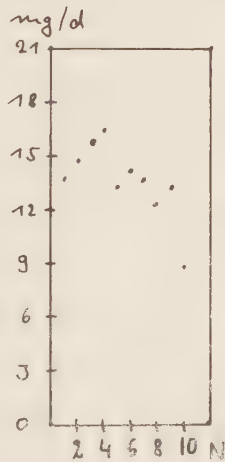
OH:SV♀



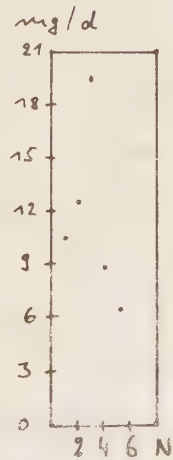
OH:N♀



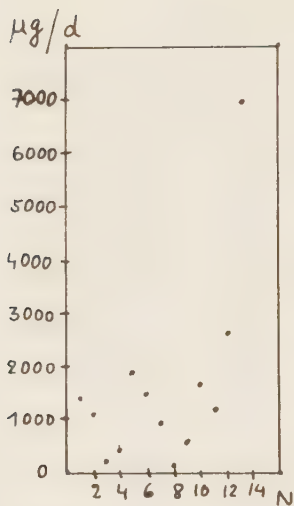
OH:U♂



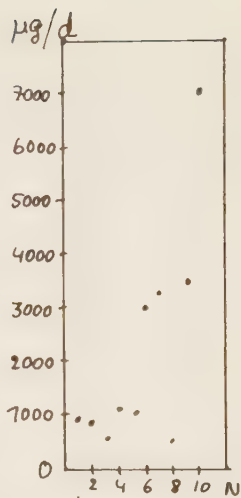
OH:SV♂



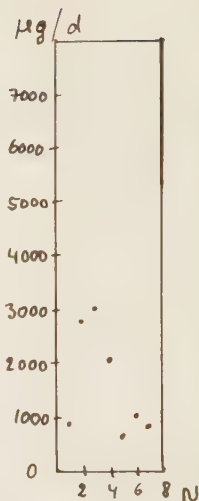
OH:N♂



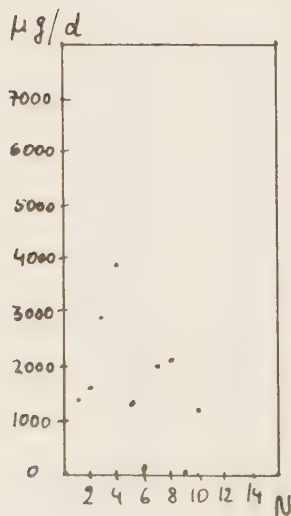
Triol: U ♀



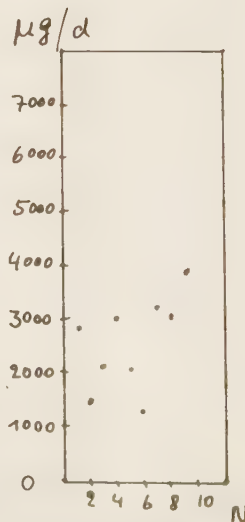
Triol: SV ♀



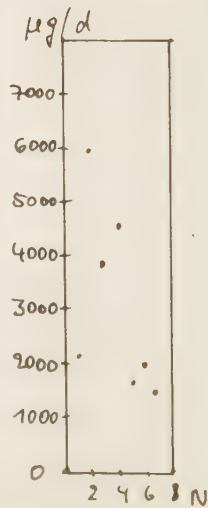
Triol: N ♀



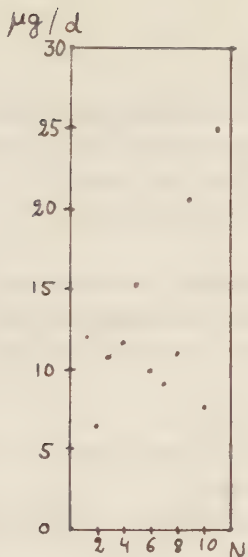
Triol: U ♂



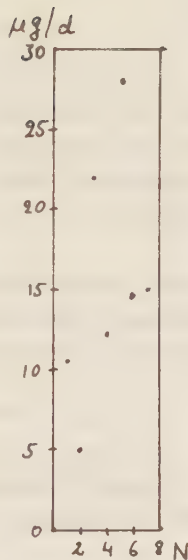
Triol: SV ♂



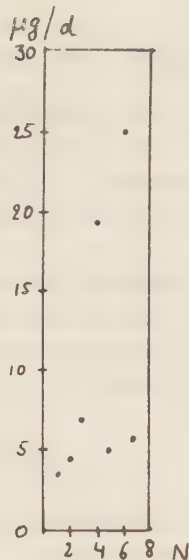
Triol: N ♂



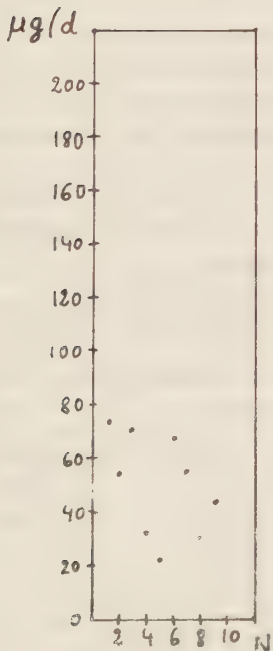
Testo: U ♀



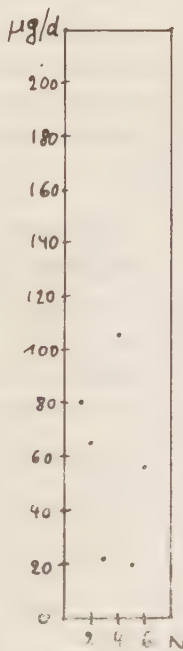
Testo: SV ♀



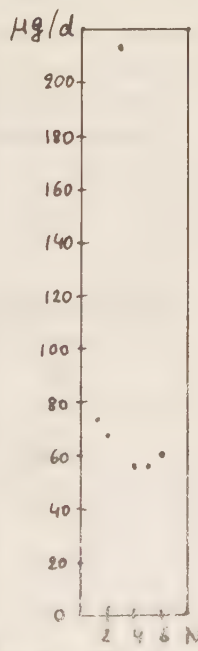
Testo: N ♀



Testo: U ♂



Testo: SV ♂



Testo: N ♂

Statistik:

Bei erster Betrachtung der Ergebnisse zeigt sich, daß ein Vater ($U\sigma^{\nearrow}$, Nr.22) offensichtlich ein bisher nicht bekannter Homozygoter ist (Pregnanetriol-Wert: 24 000 $\mu\text{g/d}$!). In der Statistik wird er deshalb nicht mitberücksichtigt.

Im folgenden werden mögliche Unterschiede zwischen den Werten der einzelnen Elterngruppen und denen der Normalpersonen mit Hilfe des t-Tests (STUDENT) statistisch überprüft. (Nach RICHTERICH,39)

t-Test (Prüfung auf Signifikanz der Differenz zweier Mittelwerte):

Zur Erläuterung werden die Gruppen $U\sigma^{\nearrow}/N\sigma^{\nearrow}$ - 17-KS ausführlich berechnet:

	$N\sigma^{\nearrow}$	$U\sigma^{\nearrow}$	Erklärungen
$\bar{x}$	12,9	12,7	arithmet. Mittel
N	5	12	Anzahl der Einzelwerte
$\sum x$	64,8	152	Summe der Einzelwerte
$\sum x^2$	1073,4	2090,6	Summe der Quadrate der Einzelwerte
N-1	4	11	
$\frac{(\sum x)^2}{N}$	840	1925	Berechnung der Summe der Quadrate der Abweichungen:
a^2	233,4	165,6	$a^2 = \sum x^2 - (\sum x)^2 : N$
$a_1^2 + a_2^2$	399		Schätzung der Standardabweichung beider Kollektive:
$(N_1-1)+(N_2-1)$	15		
s_{1+2}^2	26,6		$s_{1+2} = \sqrt{(a_1^2 + a_2^2) : ((N_1-1)+(N_2-1))}$
s_{1+2}	5,16		

$\frac{1}{N_1}$	0,2	Berechnung der Streuung der Differenz der arithmet. Mittelwerte
$\frac{1}{N_2}$	0,83	
$\frac{1}{N_1} + \frac{1}{N_2}$	1,03	$r_{\bar{x}_1 - \bar{x}_2} = s_{1+2} \sqrt{\frac{1}{N_1} + \frac{1}{N_2}}$
$\sqrt{\frac{1}{N_1} + \frac{1}{N_2}}$	1,015	
$r_{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}$	5,25	

$\bar{x}_2 - \bar{x}_1$	0,2	Berechnung von t :
t	0,038	$t = (\bar{x}_2 - \bar{x}_1) : (r_{\bar{x}_1 - \bar{x}_2})$

$$n = (N_1 - 1) + (N_2 - 1) \quad 15$$

Wahrscheinlichkeit eines zufälligen Eintreffens der Resultate:
 $1,00 > p > 0,90$

Der Wert für p ist in diesem Fall kleiner als 1,00 und größer als 0,90. Er besagt, daß der Unterschied der beiden Mittelwerte zu 90 - 100% ein rein zufälliger ist. In 100 weiteren Untersuchungswerten würden voraussichtlich maximal 9 Werte eine Abweichung von den Werten eines gleich großen Normalkollektivs ergeben.

Die Werte für p der übrigen Gruppen:

(Werte für p über 0,20: keine bzw. keine verwertbare Signifikanz; Werte unter 0,02: hohe Signifikanz)

Gruppe	17-KS	17-OHCS
U♂/N♂	$1,00 > p > 0,90$	$0,40 > p > 0,30$
SV♂/N♂	$0,60 > p > 0,50$	$0,30 > p > 0,25$
U♀/N♀	$0,80 > p > 0,70$	$1,00 > p > 0,90$
SV♀/N♀	$0,60 > p > 0,50$	$1,00 > p > 0,90$

Gruppe	Pregnanetriol	Testosteron
U♂/N♂	0,50 > p > 0,40	0,20 > p > 0,10
SV♂/N♂	0,50 > p > 0,40	0,50 > p > 0,40
U♀/N♀	- - -	0,50 > p > 0,40
SV♀/N♀	- - -	0,30 > p > 0,25

Die Pregnanetriol-Werte der Gruppen U und SV weisen schon augenscheinlich eine so große Streubreite auf, daß auf den t-Test verzichtet werden kann. Standardabweichung und Variationskoeffizient betragen:

$$\begin{aligned}
 &U♀: \bar{x} = 1600 \mu g \\
 &\quad s = 1500 \mu g \\
 &\quad v = 98\% \\
 &SV♀: \\
 &\quad \bar{x} = 2200 \mu g \\
 &\quad s = 2100 \mu g \\
 &\quad v = 98\%
 \end{aligned}
 \qquad
 v = \frac{s \cdot 100}{\bar{x}} \quad (\%)$$

Beurteilung:

Der niedrigste Wert für p liegt zwischen 0,20 und 0,10 (Testosteron Gruppe U♂/N♂). Nur gering ist also die Signifikanz dafür, daß die Väter von Kindern mit unkompliziertem AGS mehr Testosteron ausscheiden als normale Vergleichspersonen.

Alle übrigen p-Werte zeigen, daß die in den Mittelwerten sichtbaren Differenzen mehr oder weniger zufällig aufgetreten sind.

D. Diskussion

Die individuelle Streubreite der Steroidhormon-Ausscheidung ist erheblich. Besonders stark ausgeprägt ist sie für die 17-OHCS im Stress. KNORR (25) gibt für die fraktionierten 17-KS bei gesunden Kindern einen Variationskoeffizienten von 18 - 31% an. BASOE et al. (3) berichten von einem Patienten mit Cushing-Syndrom, der - über Tage gemessen - in manchen Einzelbestimmungen scheinbar normale Steroidwerte zeigte.

Für Testosteron ermittelten DRAY et al. (13) bei Versuchspersonen an verschiedenen Tagen Schwankungen der Ausscheidung bis zu $\pm 30\%$ des Mittelwertes.

Die Verwertbarkeit der Pregnanetriol-Bestimmungen bei den Müttern bzw. Frauen erscheint, verglichen mit einer Arbeit von PICKETT et al. (34), fraglich; denn auch die Pregnanetriol-Ausscheidung ist zyklusabhängig. Diese Schwankungen sind so groß, daß sich die von uns gesuchten Abweichungen dahinter verbergen könnten.

Die erste Untersuchung, die Eltern von AGS-Patienten miteinbezieht, stammt von JENSEN und BJÖRKLUND (21). Sie bestimmten bei einer Familie, in der das Kind am adrenogenitalen Salzverlustsyndrom litt, verschiedene 17-Ketosteroide. Bei der Mutter fanden sie die gesamten 17-KS im oberen Normbereich, stark erhöht das Dehydroisoandrosteron. Die 17-KS-Werte des Vaters bezeichnen sie als "feminin". Die Autoren schließen aus ihren Befunden auf mögliche Heredität des Leidens.

Wenig später ermittelten CHILDS et al. (10) in der bereits eingangs zitierten Arbeit zur Genetik des AGS bei 20 Elternpaaren von AGS-Patienten die Pregnanetriol-Ausscheidung unter einer AGS-Belastung von 60-80 I.E.. Die Werte lagen dabei im Mittel um 2 - 5% höher als beim Normalkollektiv. Die Autoren schließen, daß eine Heredität des AGS sehr wahrscheinlich ist. CLEVELAND et al. (11) verabreichten 5 AGS-Kindern und ihren Eltern den C-11-Hydroxylase-Inhibitor SU 4885 (Metopiridon). Bei Hemmung der C-11-Hydroxylase werden die Ausscheidungen des AGS verstärkt; im extremen Fall bleibt die Corticosteroidsynthese auf der Stufe des 17-Hydroxyprogesteron stehen. Während die Autoren bei den Kindern die verstärkten Befunde er-

heben, finden sie bei den Eltern bis auf eine Ausnahme keine pathologischen Abweichungen. Nur ein Vater zeigt einen erhöhten Pregnanetriol-Wert und eine gering vermehrte 17-OHCS-Ausscheidung. Leider wurden die 17-OHCS nach der Methode von PORTER und SILBER (40) bestimmt, die gerade bei dieser Fragestellung wenig geeignet ist. Ihre Vermutung geht dahin, daß dieser Vater ein bisher nicht erkannter Homozygoter mit minimalen klinischen Symptomen ist.

In der jüngsten Veröffentlichung über AGS-Heterozygote und Heterozygote anderer NNR-Störungen berichten SULCOVA et al. (44) von 7 AGS-Familien: In den 17-KS-Fractionen, bei einzelnen Corticoiden und beim Pregnanetriol (Bestimmungs-Methode: STARKA et al., 43) ergaben sich verschiedengradige positive und negative Abweichungen von der Norm. Sie ließen jedoch in Qualität und Quantität keine Schlüsse auf den Grad der kindlichen Stoffwechselstörung zu. Die Untersucher stellen weiter fest, daß dort, wo insbesondere die Pregnanetriol-Werte bei den Kindern stark von der Norm abwichen, bei den Eltern keine abnormen Werte vorlagen.

Unsere eigenen Untersuchungen ergeben: ein Teil der Werte, besonders die Pregnanetriol-Bestimmungen Gruppe U ♂ und U ♀, die 17-OHCS in Gruppe U ♀, lassen eine große Variabilität mit einzelnen weit herausragenden Extremwerten erkennen. Im Gegensatz dazu erscheinen die Kollektive SV ♂ -Pregnanetriol und SV ♀ -17-OHCS eher einheitlich. Gerade die Eltern von Kindern mit unkompliziertem AGS weisen also z.T. starke Abweichungen untereinander auf, während die Väter (SV ♂) und Mütter (SV ♀) von AGS-Salzverlust-Patienten verblüffend geringe Streuung ihrer Werte zeigen. Hier mag man eine Beziehung zu den Ergebnissen von SULCOVA et al. sehen.

Abschließend müssen auch wir die Frage, ob die Heterozygoten des AGS klinisch nachweisbare und aussagefähige Unterschiede in ihrer Steroidausscheidung gegenüber Normalpersonen aufweisen, zumindest für die von uns untersuchten Hormone verneinen. Es bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten, Heterozygotentypische Veränderungen nachzuweisen.

E. Zusammenfassung

Mit der Absicht, einen Heterozygoten-Test zu finden, wurden 13 Elternpaare, deren Kinder an unkompliziertem adrenogenitalem Syndrom leiden, und 10 Elternpaare von Kindern mit adrenogenitalem Salzverlustsyndrom auf Abweichungen ihrer Steroidausscheidung gegenüber Normalpersonen untersucht.

Bestimmt wurden die neutralen 17-Ketosteroide, die totalen 17-Hydroxycorticoide, Pregnanetriol und Testosteron im 24-Std.-Urin. Die Methoden sind beschrieben, die Ergebnisse statistisch ausgewertet worden.

Der Vergleich der Kollektive ergab keine klinisch verwertbaren Aussagen. Einer teilweise erhöhten Variabilität in den Einzelwerten der Eltern von Kindern mit unkompliziertem AGS standen eher einheitliche Werte bei den Eltern der Patienten mit adrenogenitalem Salzverlustsyndrom gegenüber.

Ein brauchbarer Heterozygoten-Test ist durch noch eingehendere Untersuchungen möglicherweise zu entwickeln.

F. Literaturnachweis

- 1 APPLEBY, J.L., G.GIBSON, J.K. NORIMBERSKI and R.D. STUBBS:
 Indirect analysis of corticosteroids
 Bioch. J. 60 (1955), 453 und 460
- 2 BARTTER, F.C., R.I. HENKIN, G.T. BRYAN:
 Aldosterone hypersecretion in "non salt loosing"
 congenital adrenal hyperplasia
 J. clin. Invest. 47 (1968), 1742
- 3 BASSOE, H.H., R. EMBERLAND and K.F. STÖA:
 Fluctuating steroid excretion in Cushing's syndrome
 Acta endocr. (Kbh.) 28 (1958), 163
- 4 BONGIOVANNI, A.M.:
 The detection of pregnanediol and pregnanetriol in
 the urine of patients with adrenal hyperplasia.
 Suppression with cortisone
 Bull. Johns. Hopkins Hosp. 92 (1953), 244
- 5 BONGIOVANNI, A.M., W.R. EBERLEIN and J. CARA:
 Studies on the metabolism of the adrenal steroids
 in the AGS
 J. clin. Endocr. 14 (1954), 408
- 6 BONGIOVANNI, A.M., W.R. EBERLEIN:
 Defective steroidal biogenesis in congenital
 adrenal hyperplasia. II. The salt loosing form of
 congenital adrenal hyperplasia.
 Pediatrics 21 (1958), 667
- 7 BONGIOVANNI, A.M. and G. KELLENBENZ:
 The adrenogenital syndrome with deficiency of
 3 -hydroxysteroid dehydrogenase
 J. clin. Invest. 41 (1962), 2086

- 8 BROWNIE, A.C., H.J. VANDENMOLEN, E.F. NISHIZAWA and K.B. EIK-NES:
Determination of testosterone in human peripheral blood using gas-liquid-chromatography, with electron capture detection
J. clin. Endocr. 24 (1964), 1091
- 9 CAMACHO, A.M. and C.J. MIGEON:
Testosterone excretion and production rate in normal adults and in patients with congenital adrenal hyperplasia
J. clin. Endocr. 26 (1966), 893
- 10 CHILDS, B., M.M. GRUMBACH and J.J. VAN WYK:
Virilizing adrenal hyperplasia. A genetic and hormonal study
J. clin. Invest. 35 (1956), 213
- 11 CLEVELAND, W.W., M. NIKEZIC and C.J. MIGEON:
Response to an 11-hydroxylase inhibitor (SU 4885) in males with adrenal hyperplasia and their parents
J. clin. Endocr. 22 (1962), 281
- 12 DEGENHART, H.J., H.K.A. VISSER, R. WILMINK and W. CROUGHS:
Aldosterone and cortisol secretion rates in infants and children with congenital adrenal hyperplasia suggesting different 21-hydroxylation defects in "salt-loosers" and "non-salt-loosers"
Acta endocr. (Kbh.) 48 (1965), 587
- 13 DRAY, F. et J. MOWSZOWICZ:
Dosage du glucuronide de testostérone urinaire par une méthode de double dilution isotopique
Rev. Franc. Etud. Clin. Biol. 11 (1966), 840
- 14 EBERLEIN, W.R. and A.M. BONGIOVANNI:
Pathophysiology of congenital adrenal hyperplasia
Metabolism 9 (1960), 326

- 15 FRANCE, J.T. and B.S. KNOX:
Urinary excretion of testosterone and
epitestosterone in hirsutism
Acta endocr. (Kbh.) 56 (1967), 177
- 16 FREISLEDERER, W., I. BUTENANDT, I. BRÜNING und G.WIDMAIER:
Die Ausscheidung der C-17 ketogenen Steroide im
Urin gesunder Kinder
Klin. Wschr. 37 (1959), 817
- 17 GREEN, A.G. and C.N. PULVERTAFT:
17-ketosteroid and 17-hydroxysteroid axcretion in
patients with duodenal ulceration
J. brit. Soc. Gastroenterol. 3 (1962), 327
- 18 GRUMBACH, M.M. and L. WILKINS:
The pathogenesis and treatment of virilizing
adrenal hyperplasia
Pediatrics 17 (1956), 418
- 19 HAMBURGER, C.:
Normal urinary excretion of neutral 17-ketosteroids
with special reference to age and sex variations
Acta endocr. (Kbh.) 1 (1948), 19
- 20 HÜBENER, H.J. und STAIB, W.H.:
Biochemie der Nebennierenrinden-Hormone
G. Thieme Verlag, Stuttgart 1965
- 21 JENSEN, C.C. and S.I. BJÖRKLUND:
The adrenogenital syndrome
Acta endocr. (Kbh.) 22 (1956), 42
- 22 KARL, H.J.:
Funktion der Nebennierenrinde bei Frauen mit
Hirsutismus und Zyklusstörungen
Klin. Wschr. 38 (1960), 634

- 23 KELLEY, V.C., R.S. ELY and R.B. RAILE:

Metabolic studies in patients with congenital adrenal hyperplasia. Effects of cortisone therapy

J. clin. Endocr. 12 (1952), 1140

- 24 KLEIN, R., P. TAYLOR, C. POPADATOS, Z. LARON, O. KEELE, J. FORTIMATO, C. BEYERS and C. BILLINGS:

Sodium loosing material in human urine

Proc. Soc. exp. Biol. 98 (1958), 863

- 25 KNORR, D.:

Untersuchungen zur Altersabhängigkeit der Ausscheidung einzelner chromatographisch getrennter Steroide während des Kindes- und Reifungsalters

in: Fortschritte der Pädologie; Herausgeb.: LINNEWIEH, F. Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1965

- 26 KNORR, D.:

Über die Ausscheidung von freiem und glukuronsäuregebundenem Testosteron im Kindes- und Reifungsalter

Acta endocr. (Kbh.) 54 (1967), 215

- 27 KNORR, D.:

Normal values for urinary testosterone in boys and adolescents

Proceedings of the Workshop Conference, April 1967, Tremsbüttel; G. Thieme Verlag, Stuttgart 1968

- 28 KNUDSON, A.G.

Mixed adrenal disease of infancy

J. Pediat. 39 (1951), 408

- 29 KOWARSKI, A., J.W. FINKELSTEIN, J.S. SPAULDING, G.H. HOLMAN and C.J. WIGTON:

Aldosterone secretion rate in congenital adrenal hyperplasia. A discussion of the theories on the pathogenesis of the syndrome

- 30 LINNEWEH, F.:

Fortschritte in der Diagnostik heterozygoter Merkmalsträger bei erblichen Stoffwechselkrankheiten

Mtschr. Kinderheilkunde 112 (1964), 169

- 31 LEHNERT, G., W. MÜCKE und H. VALENTIN:

Über eine Methode zur gaschromatographischen Analyse von 11-Desoxy-17-Ketosteroiden im Harn und ihre Ergebnisse beim Menschen

Endokrinologie 46 (1964), 241

- 32 LUKKAINEN, T., W.J. VANDENHEUVEL, E.O. HAAHTI and E.C. HORNING:

Gaschromatographic behavior of trimethylsilyl ethers of steroids

Biochim. Biophys. Acta 52 (1961), 599

- 33 OERTEL, G.W.:

Chemische Bestimmung von Steroiden im menschlichen Harn

Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1964

- 34 PICKETT, M.T., A.E. KELLIE and J.F. SOMERVILLE:

Urinary excretion of pregnanetriol in the menstrual cycle

Acta endocr. (Kbh.) 41 (1962), 129

- 35 PRADER, A.:

Pseudohermaphroditismus femininus mit kongenitaler Nebennierenrinden-Insuffizienz

Helv. paediat. acta 5 (1950), 426

- 36 PRADER, A.:

Die Häufigkeit des kongenitalen adrenogenitalen Syndroms

Helv. paediat. acta 13 (1958), 426

- 37 PRADER, A., G.J.P.A. ANDERS und H. HABICH:
Zur Genetik des kongenitalen adrenogenitalen Syndroms (virilisierende Nebennierenrindenhyperplasie)
Helv. paediat. acta 17 (1962), 271
- 38 PRADER, A., A. SPAHR und R. NEHER:
Erhöhte Aldosteronausscheidung beim kongenitalen adrenogenitalen Syndrom
Schweiz. med. Wschr. 85 (1955), 1085
- 39 RICHTERICH, R.:
Klinische Chemie
Akademische Verlagsgesellschaft, Frankfurt a.M. 1965
- 40 SILBER, R.H. and C.C. PORTER:
The determination of 17,21-dihydroxy-20-ketosteroids in urine and plasma
J. biol. Chem. 210 (1954), 263
- 41 SOFFER, L.J., R.J. DORFMAN and J.L. GABRILOVE:
The human adrenal gland
Kimpton, Philadelphia 1961
- 42 STAHL, E.:
Dünnschichtchromatographie
Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1962
- 43 STÁRKA, L. and J. MALÍKOVÁ:
A simple method for the separation of pregnanetriol by spreadlayer chromatography
J. Endocr. 22 (1961), 215
- 44 SULCOVA, J., I. STÁRKA, T. SOUMAR, B. BLEHOVÁ und K. SILINK:
Über das Vorkommen von Steroidausscheidungsstörungen bei Eltern und ihren Kindern
Endokrinologie 49 (1966), 146

- 45 VANDENHEUVEL, W.J.A., B.G. GREECH and E.C. HORNING:
Separation and estimation of the principal human
urinary 17-ketosteroids as trimethylsilyl ethers
Analytical Biochem. 4 (1962), 191
- 46 VERMEULEN, A. and J.C.M. VERPLANCKE:
A simple method for the determination of testosterone excretion in human urine
Steroids 2 (1963), 453
- 47 WILKINS, L., R.A. LEWIS, R. KLEIN and E. ROSENBERG:
The suppression of androgen secretion by cortisone
in a case of congenital adrenal hyperplasia
Preliminary report,
Bull. Johns. Hopkins Hosp. 86 (1950), 249
- 48 WILKINS, L.:
The treatment of congenital virilizing adrenal
hyperplasia
First Internat. Congress of Endocrin., Copenhagen 1960
- 49 ZIMMERMANN, W., H.U. ANTON und D. PONTIUS:
Die Eliminierung störender Chromogene bei der Bestimmung der 17-Ketosteroide mit m-Dinitrobenzol
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 289 (1952), 91
- 50 ZIMMERMANN, W.:
Chemische Bestimmungsmethoden von Steroidhormonen
in Körperflüssigkeiten
Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1955

Für die Gewährung der Arbeitsmöglichkeit und die Übernahme des Korreferats danke ich Herrn Prof. Dr. Betke, Direktor der Universitäts-Kinderklinik.

Herrn Prof. Dr. Knorr, Oberarzt der Universitäts-Kinderklinik, gilt mein Dank für das Thema, für die Ratschläge und Hilfen, die er mir im Verlauf der Arbeit gegeben hat, insbesondere jedoch für die Überlassung der gaschromatographischen Meßwerte und für die sorgfältige Korrektur.

Frau Meßenzehl danke ich für die Pregnanetriol-, Frl. Suermann für die Testosteron-Bestimmungen.

Lebenslauf

Am 15. April 1945 bin ich als Sohn des Kaufmanns Alfred Toyka und seiner Frau Annemarie in Lüberach an der Riß geboren. Zwischen 1951 und 1964 besuchte ich Volksschule und altsprachliches Gymnasium in Frankfurt, Düsseldorf und zuletzt in Dortmund, wo ich die Reifeprüfung ablegte.

Vom Sommersemester 1964 bis Wintersemester 1969/70 studierte ich an der Universität München Medizin und legte am 15.7. 1970 mein Staatsexamen ab.

